云　南　植　物　研　究　2007，29 (1)：103～108
Acta Botanica Yunnanica

绿绒蒿自然杂交种及其亲本 cpDNA *trn*L- *trn*F 基因的遗传学分析*

袁长春[1]，何雪宝[1]，袁秋梅[1]，施苏华[2]
(1 湛江师范学院生化学院，广东 湛江　524048；2 中山大学生命科学学院基因工程教育部重点实验室，广东 广州　510275)

摘要：对自然杂交种 *Meconopsis*× *cookei* 及其亲本红花绿绒蒿 *M. punicea* 和五脉绿绒蒿 *M. quintuplinervia* 的叶绿体 DNA *trn*L- *trn*F 区进行了序列测定，所得序列的长度为 957～961 bp，其中 *M.* × *cookei* 的序列长度为 960 bp，红花绿绒蒿为 961 bp，五脉绿绒蒿为 957 bp。利用软件 Clustal X 对所得序列进行排序和碱基比较，排序后的序列长度为 964 bp，其中 *trn*L intron 为 512 bp，trnL 3′exon 为 50 bp，*trn*L- *trn*F intergenic spacer (IGS) 为 361 bp，还包括 41 bp 的 *trn*F 5′端片段。整个 *trn*L- *trn*F 区序列共有 25 个变异位点，其中杂交种 *M.* × *cookei* 与红花绿绒蒿具有相同碱基的位点有 21 个（占 84%），*M.* × *cookei* 与五脉绿绒蒿具有相同碱基的位点仅有 1 个（占 4%），余下 3 个位点（占 12%）中，*M.* × *cookei* 的碱基与两个亲本均不相同。分析结果表明，杂交种 *M.* × *cookei* 的叶绿体基因 *trn*L- *trn*F 来自红花绿绒蒿，根据质体细胞质遗传的规律，从而推测红花绿绒蒿为该杂交种的母本，五脉绿绒蒿为其父本。

关键词：绿绒蒿杂交种；红花绿绒蒿；五脉绿绒蒿；*trn*L- *trn*F
中图分类号：Q 943　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0253 - 2700 (2007) 01 - 103 - 06

Genetic Relationship between a Natural Hybrid *Meconopsis*× *cookei* (Papaveraceae) and Its Parents Based on cpDNA *trn*L- *trn*F Region Sequence

YUAN Chang-Chun[1]，HE Xue-Bao[1]，YUAN Qiu-Mei[1]，SHI Su-Hua[2]
(1 *Life Science and Chemistry School*，*Zhanjiang Normal University*，Zhanjiang 524048，China；2 *Key Laboratory of Gene Engineering of Ministry of Education*，*School of Life Sciences*，*Zhongshan University*，Guangzhou 510275，China)

Abstract: The Chloroplast DNA *trn*L- *trn*F region sequences from a natural hybrid species *Meconopsis*× *cookei* and its parents *M. punicea* and *M. quintuplinervia* were obtained by using direct sequencing method. The sequence length of *trn*L- *trn*F region is 960 bp for *M.* × *cookei*，961 bp for *M. punicea*，and 957 bp for *M. quintuplinervia*. The sequences were aligned by the software Clustal X，and then the bases per locus were compared by using the software with manual method. The aligned sequence length is 964 bp，of which trnL intron is 512 bp，the 3′exon of *trn*L is 50 bp，*trn*L- *trn*F intergenic spacer (IGS) is 361 bp，and the 5′end segment of *trn*F is 41 bp. Total 25 variable loci were detected from the aligned sequence，of which 21 (84%) sites are same between *M.* × *cookei* and *M. punicea*，and only one (4%) is same between *M.* × *cookei* and *M. quintuplinervia*，the remaining three loci (12%) are different among *M.* × *cookei*，*M.* - *punicea*，and *M. quintuplinervia*. The results show that the cpDNA *trn*L- *trn*F region of the natural hybrid species *M.* × *cookei* was inherited from its parent *M. punicea*. Therefore，according to the plastid inheritance law，our molecular evi-

* 基金项目：国家自然科学基金重点项目 (30070053)、广东省自然科学基金 (04300850) 和湛江师范学院博士基金 (Z0313)
收稿日期：2006 - 04 - 08，2006 - 08 - 20 接受发表
作者简介：袁长春 (1964 -) 男，副教授，博士，主要从事植物分子进化与系统学方面的研究。
E-mail：yuancc@zhjnc.edu.cn；Tel：0759 - 3183722

dences indicate that *M. punicea* is the mother of hybrid species *M.* × *cookei* and *M. quintuplinervia* is its father .

Key words: Hybrid species *Meconopsis* × *cookei*; *M. punicea*; *M. quintuplinervia*; *trn*L-*trn*F

绿绒蒿杂交种 *Meconopsis* × *cookei* G . Taylor 发表于1951年 (Taylor, 1951), 在分类学上属于罂粟科 (Papaveraceae)、绿绒蒿属 (*Meconopsis* Vig .), 为多年生草本植物, 高20～50 cm, 目前仅见于中国青海省的局部地区 (Taylor, 1951; Cobb, 1989)。因其茎、叶的形态特征与五脉绿绒蒿 (*M. quintuplinervia* Regel) 相似, 而花的形态结构又类似于红花绿绒蒿 (*M. punicea* Maxim .), 但花的颜色为紫红色, 与红花绿绒蒿为深红色而有所不同, 所以Taylor (1951) 认为它可能是五脉绿绒蒿和红花绿绒蒿的自然杂交种。早期, Andrew Harley曾在英国德文郡 (Devonhall) 进行过引种栽种, 目前已极为少见 (Cobb, 1989)。袁长春等 (2004) 已利用分子生物学的方法证明 *M.* × *cookei* 是红花绿绒蒿和五脉绿绒蒿的杂交后代。

红花绿绒蒿为多年生草本植物。叶片倒披针形或狭倒卵形; 花单生于基生花葶上, 花瓣4 (6), 深红色, 椭圆形; 蒴果椭圆状长圆形。产四川西北部、西藏东北部、青海东南部和甘肃西南部, 生于海拔2 800～4 300 m的山坡草地 (吴征镒等, 1999)。五脉绿绒蒿为绿绒篙属多年生草本植物, 叶片倒卵形至披针形; 花单生于基生花葶上, 花瓣4～6, 倒卵形或近圆形, 淡蓝色或紫色; 蒴果椭圆形或长圆状椭圆形。产湖北西部 (神农架)、四川西北部、西藏东北部、青海东北部、甘肃南部和陕西西部, 生于海拔2 300～4 600 m的阴坡灌丛中或高山草地 (吴征镒等, 1999)。

近年来, 随着分子生物学的迅速发展, 一些新的方法, 如同工酶、RFLP、SSR、DNA测序等, 被用来研究和验证杂交种 (Rauscher 等, 2002; Soltis 等, 1992; Quijada 等, 1997; Sang 等, 1995), 特别是DNA序列分析的方法, 更能准确地反映出杂交种和亲本之间的遗传关系。在以往的研究中, 我们已利用来自核基因组的nrDNA ITS区序列分析的方法证明绿绒蒿自然杂交种 *M.* × *cookei* 就是红花绿绒蒿和五脉绿绒蒿的杂交后代 (袁长春等, 2004), 但是, 因为核基因属于双亲遗传, 所以, 究竟那个是父本、那个是母本仍无法确定。叶绿体基因属于细胞质基因, 为绿色植物所特有, 其遗传方式有别于核基因的遗传方式, 属于细胞质遗传, 通常为母系遗传方式 (胡适宜, 1997; 奇文清等, 1999)。早期研究叶绿体基因的细胞质遗传主要采用遗传学和细胞学的方法 (Neale 等, 1986; Hagemann and Schroder, 1989), 近年来, 随着分子生物学技术的发展, 一些新的方法被采用, 如酶切和限制性片段长度多态性 (RFLP) 方法等 (胡适宜, 1997)。但是, 最直接的方法是分析亲本和子代在叶绿体基因上的变化, 即叶绿体DNA序列分析的方法, 这种方法快速、准确、可靠, 能准确地反映出杂交种和亲本之间的遗传关系, 且不受生长季节的限制, 目前有关这方面研究的报道甚少。本研究选择进化速率较快的叶绿体DNA *trn*L-*trn*F基因作为分子标记, 进行cpDNA序列分析, 旨在探讨杂交种 *M.* × *cookei* 与其亲本之间在叶绿体基因上的变化特点和规律, 来分析它们之间的遗传关系, 并确定其父本和母本。

1　材料和方法

1.1　实验材料

用于提取总DNA的杂交种 *M.* × *cookei* 的植物叶片采自英国爱丁堡皇家植物园标本馆收藏的腊叶标本, 该标本由D . G . Long于1997年采自青海省果洛藏族自治州玛沁县, 另外两种材料分别采自中国四川马尔康鹧鸪山和英国爱丁堡皇家植物园栽种植株, 新鲜叶片采集后经硅胶干燥备用, 每种材料均采集相应的凭证标本, 材料的详细来源及凭证标本号见表1。

表1　材料来源及凭证标本

Table 1　Source and voucher of materials

材料名称 Sample name	采集地 Locality	采集人 时间 Collector date	凭证标本 Voucher	GenBank 登录号 GenBank Accession No .
杂交种 *M.* × *cookei*	青海省果洛 Guoluo, Qinghai	D. G. Long *et al*/1997. 07. 10	00137066 (E)	AY328231
五脉绿绒蒿 *M. quintuplinervia*	英国爱丁堡皇家植物园 Royal Botanic Garden Edinburgh of UK	C. C. Yuan/2002. 07. 01	200271107 (SYS)	AY328239
红花绿绒蒿 *M. punicea*	四川马尔康 Maerkang, Sichuan	C. C. Yuan/2000. 07. 02	2000711 (SYS)	AY328238

1.2　实验方法

1.2.1　**总 DNA 提取与纯化**　总 DNA 的提取采用 CTAB 法 (Doyle and Doyle，1987)，并作适当调整（施苏华等，1996)，具体步骤如下：取干燥后的叶片约 0.5 g，置于干净的研钵中，加液氮充分研磨成粉末，近等量地分装于 4 个 1.5 mL 的离心管中，各加入 1 mL 含 0.2% β-巯基乙醇的 2×CTAB 提取液，充分摇匀，60℃保温 1 h；10 000 r/min 离心 5 min，弃沉淀，取上清液移至新管；加 700 μL 氯仿-异戊醇（v∶v = 24∶1）混合液，摇匀，10 000 r/min 离心 5 min，弃沉淀，再重复抽提 1 次；10 000 r/min 离心 10 min，弃沉淀，取上清液，加 1/10 体积的 3 mol/L NaAC（4℃)，再加异丙醇（4℃）至满管，将离心管轻轻翻转几次，-20℃放置 2 h 以上；10 000 r/min 离心 5 min，弃上清液，沉淀用 70% 乙醇洗脱 2 次，再用无水乙醇洗脱一次，晾干，加 50～100 μL 1×TE 溶液溶解，-20℃保存。

DNA 的纯化采用玻璃粉纯化系统（DPS）并按以下步骤进行：取 50 μL DNA 1×TE 溶液加入 3 倍体积的 6 mol/L NaI 和 3 μL 玻璃粉 1×TE 溶液，混匀，8 000 rpm 离心 2 min；弃上清液，加洗脱液［含 0.2 mol/L NaCl，10 mmol/L Tris-HCl (pH8.0)，1 mmol/L EDTA，50%（v/v）Ethanol］100 μL，混匀，8 000 r/min 离心 2 min，弃上清液，重复洗脱 3 次，晾干；加 50 μL 1×TE 溶液，50℃保温 15～20 min，至沉淀完全溶解，10 000 r/min 离心 10 min，弃沉淀，将上清液移至新管，-20℃保存备用。

1.2.2　**PCR 扩增与测序**　采用人工合成的通用引物 c (5′-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3′）和 f（5′-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3″)，按如下程序进行 PCR 扩增：94℃ 4 min；94℃ 1 min，58℃ 2 min，72℃ 2 min，30 个循环；72℃ 6 min。PCR 产物用 QIAGEN 公司的 PCR 纯化试剂盒进行纯化，然后采用 ABI 3700 型自动测序仪进行测序，测序引物为 c（序列同上)、f（序列同上)、d (5′-GGGGATAGAGGGACTTGAAC-3′)、e（5′-GGTTCAAGTCCCTC TATCCC-3′)，以上引物的序列来源于 Taberlet 等（1991）的文献。

1.2.3　**序列拼接与排序**　序列的编辑和拼接用 Seqman™II (DNASTAR Inc.）软件完成，并借助软件 Chromas2.0 进行人工校对，*trn*L-*trn*F 区序列［包括 *trn*L intron、*trn*L 3′exon、*trn*L-*trn*F intergenic spacer（IGS）和 *trn*F］的边界根据 GenBank 中的近缘种序列进行确定，所有序列均输送到 GenBank，其登录号见表 1。序列的排序采用 Clustal X 1.81 软件（Thompson 等，1997）进行，并进行手工校对。

2　结果

2.1　序列长度及碱基组成

所测样品的 *trn*L-*trn*F 序列长度（含 *trn*L intron、*trn*L 3′exon、IGS、*trn*F 5′端部分序列）为 957～961 bp，其中杂交种 *M.* × *cookei* 为 960 bp，红花绿绒蒿为 961 bp，五脉绿绒蒿为 957 bp。在 *trn*L intron 区，红花绿绒蒿和 *M.* × *cookei* 的长度均为 512 bp，五脉绿绒蒿为 510 bp；在 *trn*L 3′exon 区，红花绿绒蒿和 *M.* × *cookei* 的长度均为 50 bp，五脉绿绒蒿为 49 bp；在 IGS 区，红花绿绒蒿和 *M.* × *cookei* 长度均为 358 bp，五脉绿绒蒿为 357 bp；在 *trn*F 片段中，红花绿绒蒿和五脉绿绒蒿长度均为 41 bp，*M.* × *cookei* 为 40 bp。排序后的 *trn*L-*trn*F 序列长度为 964 bp，其中 *trn*L intron 为 512 bp，*trn*L 3′exon 为 50 bp，IGS 为 361 bp，还包括 41 bp 的 *trn*F 5′端序列。各个样品的详细序列组成见图 1。

2.2　变异位点及其碱基类型

在整个 *trn*L-*trn*F 区序列中，3 个样品之间共有 25 个变异位点（同一位点上所有样品的碱基类型不完全相同，图 1)，占整个序列长度的 2.59%。其中有 11 个变异位点属于碱基插入或缺失（insertion-deletion）类型，占变异位点总数的 44%，占整个序列长度的 1.14%。在这 11 个位点中，*trn*L intron 区有 2 个（占 18.18%)，*trn*L 3′exon 中有 1 个（占 9.09%)，IGS 区有 7 个（占 63.64%)，*trn*F 中有 1 个（占 9.09%)。在这些插入或缺失类型的变异位点中，杂交种 *M.* × *cookei* 与亲本红花绿绒蒿在其中 10 个位点上具有相同的碱基缺失或插入（占 90.91%)，其中没有一个位点与另一亲本五脉绿绒蒿具有相同的碱基缺失或插入，余下 1 个位点上与两个亲本都不同（占 9.09%）(表 2)。

另外，有 14 个变异位点属于碱基替换类型，占整个变异位点总数的 56%，占整个序列长度的 1.45%，其中，*trn*L intron 区有 8 个（占 57.14%)，IGS 区有 6 个（占 42.86%)。在这 14 个变异位点中，杂交种 *M.* × *cookei* 与亲本红花绿绒蒿在其中 11 个位点上具有相同的碱基类型（占 78.57%)，仅仅在其中 1 个位点与另一亲本五脉绿绒蒿具有相同的碱基类型（占 7.14%)，余下的 2 个位点上与两个亲本都不同（占 14.29%）(表 3)。

综合表 2 和表 3 的结果，在 25 个变异位点中，*trn*L intron 区有 10 个，占变异位点总数的 40%，*trn*L 3′exon 和 *trn*F 片段中各有 1 个，各占变异位点总数的 4%，IGS 区有 13 个，占变异位

点总数的52%。同时，在全部25个变异位点中，杂交种 *M.* × *cookei* 与亲本红花绿绒蒿在其中21个位点（占84%）上具有一致的碱基，仅仅在其中1个位点（占4%）上与五脉绿绒蒿具有相同的碱基类型，余下3个位点（占12%）上与两个亲本均不相同。

3 讨论

植物细胞质遗传涉及细胞质中的含有DNA两种细胞器从亲代到子代的传递，即线粒体和质体的遗传，相对来说，线粒体遗传的研究远不及质体的多，这可能是线粒体这种细胞器缺乏合适的表型突变体之故（胡适宜，1997）。早期对质

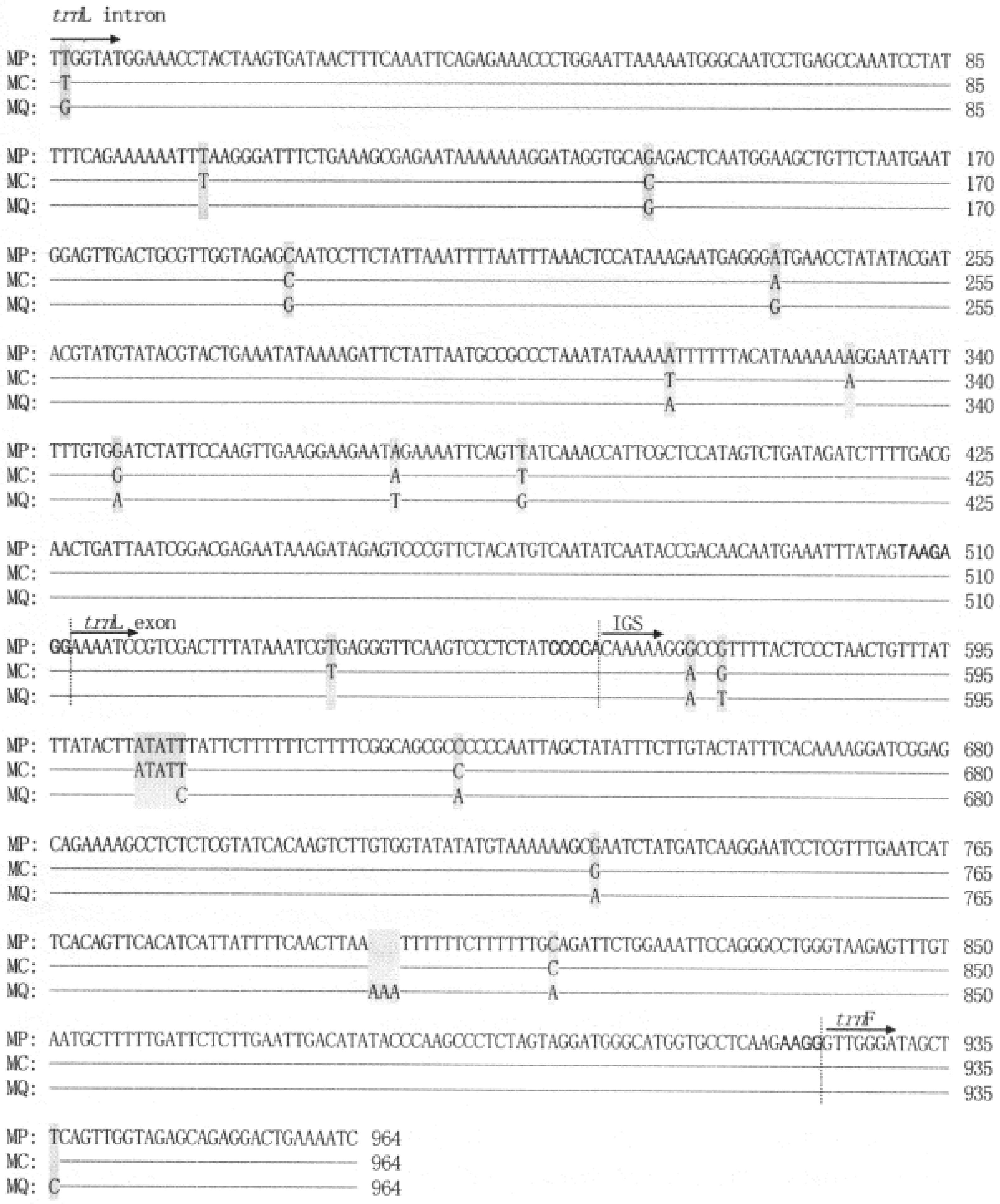

图1 所测样品的 *trn*L-*trn*F 区完整序列　MP：红花绿绒蒿；MC：杂交种 *M.* × *cookei*；MQ：五脉绿绒蒿

Fig. 1 The full sequences of *trn*L-*trn*F region of three samples

MP: *Meconopsis punicea*; MC: *M.* × *cookei*; MQ: *M. quintuplinervia*. The numbers on the right indicate the length (bp) of the sequences.

表 2　*trn*L-*trn*F 区变异位点（插入或缺失）及碱基类型

Table 2　The variable loci (insertion-deletion) and base types of *trn*L-*trn*F region sequences

样品 Sample	位点编号及碱基类型 Locus number and base type										
	*trn*L intron		3′exon	*trn*L-*trn*F IGS							*trn*F
	100	331	537	604	605	606	607	796	797	798	936
红花绿绒蒿 *M. punicea*	T	A	T	A	T	A	T	-	-	-	T
M. × *cookei*	T	A	T	A	T	A	T	-	-	-	-
五脉绿绒蒿 *M. quintuplinervia*	-	-	-	-	-	-	-	A	A	A	C

表 3　*trn*L-*trn*F 区变异位点（碱基替换）及碱基类型

Table 2　The variable loci (base substitution) and base types of *trn*L-*trn*F region sequences

样品 Sample	位点编号及碱基类型 Locus number and base type													
	*trn*L intron								*trn*L-*trn*F IGS					
	2	142	193	239	314	347	373	385	571	574	608	634	732	813
红花绿绒蒿 *M. punicea*	T	G	C	A	A	G	A	T	G	G	G	C	G	C
M. × *cookei*	T	C	C	A	T	G	A	T	A	G	G	C	G	C
五脉绿绒蒿 *M. quintuplinervia*	G	G	G	G	A	A	T	G	A	T	A	A	A	A

体基因组突变性状遗传分析的研究表明，在被子植物中存在双亲质体遗传和单亲母系质体遗传两种类型，而后一种占大多数，仅少数是比较有规律的双亲质体遗传或偶尔是双亲质体遗传（Gillharm，1978；Tileny-Bassett，1978；Smith，1988；胡适宜，1997）。上个世纪 80 年代分子生物学技术引入到细胞器 DNA 传递的研究中，发现在高等植物中除了上述两种质体遗传类型外，还存在单亲父系质体遗传的形式，Neale 等（1986）利用 RFLP 方法首先在裸子植物中发现存在质体父系遗传方式，已证明父系质体遗传在裸子植物中较为普遍（Hagemann，1992；胡适宜，1997），但在被子植物中只少数具有这种遗传方式，迄今只在紫苜蓿（*Medicago savita*）、胡萝卜属（*Daucus*）和牵牛属（*Pharbitis*）提供了父系质体遗传的证据（Schumann and Hancock，1989；Boblenz 等，1990；胡赞民等，1996）。

从植物细胞质遗传的规律以及有性生殖的特点可知，当两个亲本杂交时，如果是母系遗传，母本对子代具有决定性的作用，这是因为通常母本的配子细胞大，含有大量的细胞质，而父本的配子细胞很小，往往只含有极少量的细胞质，根据超微结构的观察，在一些植物中证明了配子融合时精细胞的细胞质被排除在卵细胞之外(Mogensen，1988；胡适宜，1997)。因为大多数被子植物的叶绿体的遗传方式为单亲母系遗传，即子代的叶绿体基因来源于母本。因此，在已确定一个杂交种的两个亲本的情况下，可以利用叶绿体基因的遗传特点来判断杂交种的母本是谁、父本是谁，同时，也可以反过来利用叶绿体基因的遗传特点来帮助确定杂交种的亲本以及研究植物的细胞质遗传规律。

本研究所选择叶绿体 DNA *trn*L-*trn*F 分子标记，在进化上具有选择压力小和进化速率较快的特点，较为适合种间杂交的质体遗传分析。比较排序后杂交种 *M.* × *cookei* 及其亲本的 *trn*L-*trn*F 区序列，共有 25 个变异位点，其中杂交种 *M.* × *cookei* 与亲本红花绿绒蒿在其中 21 个位点上彼此的碱基构成一致，占整个变异位数的 84%；而该杂交种与另一亲本五脉绿绒蒿仅在一个位点上彼此的碱基相同，仅占整个变异位点数的 4%，因而可以推测杂交种 *M.* × *cookei* 的叶绿体基因 *trn*L-*trn*F 来自亲本红花绿绒蒿。另外，从表 3 中可以看出，在第 142 和第 314 两个位点上 *M.* × *cookei* 的碱基与两个亲本均不同，第 571 个位点上 *M.* × *cookei* 的碱基与红花绿绒蒿的碱基不同，这可能是因为经历了较长时间的繁衍，而第 142 和第 314 两个位点所处的 *trn*L intron 区及第 571 个位点所处的 *trn*L-*trn*F IGS 区属于非编码区，具有较小的选择压力，进化速率较快，加上分布地点和生境的不同，因而杂交种 *M.* × *cookei* 在演化过程中发生碱基替换，即第 142 位上的碱基 G 突变为 C，第 314 位上的碱基 A 突变为 T，第 571 位上的碱基 G 突变为 A。同样的理由，第 936 个位点上 *M.* × *cookei* 缺失一个碱基 T。

综上所述，杂交种 *M.* × *cookei* 的叶绿体基

因来自亲本红花绿绒蒿，根据被子植物叶绿体基因组的母系遗传的特点，推测红花绿绒蒿为杂交种 *M.*× *cookei* 的母本，五脉绿绒蒿为其父本。

致谢 英国爱丁堡皇家植物园提供部分实验材料，美国哈佛大学 David Boufford 博士和 Anthony Brach 博士提供原始文献方面的帮助。

〔参 考 文 献〕

Boblenz K，Thomas N，Michael M，1990．Paternal inheritance of plastid in the genus *Daucus* ［J］．*Mol Gen Genet*，**220**：489—491

Cobb JLS，1989．Meconopsis ［M］．Portland，Oregon：Timber Press，1—125

Doyle J，Doyle JL，1987．A rapid DNA isolation method for small quantities of fresh tissues ［J］．*Phytochem Bull*，**19**：11—15

Gillharm NW，1978．Organelle Heredity ［M］．New York：Raven Press，5—49

Hagemann K，1992．Plastid genetics in higher plants ［A］．In：Hemann RG，Cell Organelles ［M］．New York：Springer-Verlag，65—96

Hagemann R，Schroder MB，1989．The cytological basis of plastid inheritance in angiosperms ［J］．*Protoplasma*，**152**：57—64

Hu SY（胡适宜），1997．A cytological study of plastid inheritance in angiosperms ［J］．*Acta Bot Sin*（植物学报），**39**（4）：363—371

Hu ZM（胡赞民），Hu SY（胡适宜），Zhang JZ（张金忠），1996．Paternal inheritance of plastid DNA in genus *Pharbitis* ［J］．*Acta Bot Sin*（植物学报），**38**（4）：253—256

Mogensen HL，1988．Exclusion of male mitochondria and plastids during syngamy in barley as a basis for maternal inheritance ［J］．*Proc Natl Acad Sci*，**85**：2594—2597

Neale DB，Whecler NC，Allard RW，1986．Paternal inheritance of chloroplast DNA in Douglas fir ［J］．*Can J For Res*，**16**：1152—1154

Qi WQ（奇文清），Yang HJ（杨慧君），Xue YB（薛勇彪）*et al*．1999．Inheritance of chloroplast and mitochondrial DNA in Chinese Fir（*Cunninghamia lanceolata*）［J］．*Acta Bot Sin*（植物学报），**41**（7）：695—699

Quijada A，Liston A，Robinson W *et al*．1997．The ribosomal ITS region as a marker to detect hybridization in pines ［J］．*Mol Ecol*，**6**：995—996

Rauscher JT，Doyle JJ，Brown AHD，2002．Internal transcribed spacer repeat-specific primers and the analysis of hybridization in the *Glycine tomentella*（Leguminosae）polyploid complex ［J］．*Mol Ecol*，**11**（12）：2691—2702

Sang T，Crawford DJ，Stuessy TF，1995．Documentation of reticulate evolution in peonies（*Peonia*）using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA：implications for biogeography and concerted evolution ［J］．*Pro Nati Acad Sci*，**92**：6813—6817

Schumann CM，Hancock JF，1989．Paternal inheritance of plastid in *Medicago sativa* ［J］．*Theor Appl Genet*，**78**：862—866

Shi SH（施苏华），Zhang Q（章群），Chen YQ（陈月琴）*et al*．1996．A simple method for isolation of total RNA and DNA from silicagel-dried and fresh leaves of plants ［J］．*Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*（中山大学学报自然科学版），**35**（2）：103—105

Smith SE，1988．Biparental inheritance of organelle and implication in crop improvement ［J］．*Plant Breed Rev*，**6**：361—393

Soltis PS，Doyle JJ，Soltis DE，1992．Molecular data and polyploid evolution in plants ［A］．In：Soltis PS，Soltis DE，Doyle JJ，eds．Molecular Systematics of Plants ［M］．New York：Chapman & Hall，177—201

Taberlet P，Gielly L，Pautou G *et al*．1991．Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA ［J］．*Plant Mol Biol*，**17**：1105—1109

Taylor G，1951．Two new *Meconopsis* hybrids ［J］．*J Roy Hort Soc*，**126**：231—232

Thompson JD，Gibson TJ，Plewniak F，1997．The Clustal X windows interface：flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools ［J］．*Nucl Acids Res*，**25**：4876—4882

Tileny-Bassett RAE，1978．The inheritance and genetic behavior of plastids ［A］．In：Kirk JTO，Tileny-Bassett RAE *et al*．The Plastids ［M］．Amsterdam：Elsevier，251—234

Wu ZY（吴征镒），Zhuang X（庄璇），Su ZY（苏志云）*et al*．1999．Flora Reipublicae Popularis Sinicae（Tomus 32）［M］．Beijing：Science Press，30—37

Yuan CC（袁长春），Li PX（黎培新），Wang YF（王燕芳）*et al*．2004．The confirmation of putative natural hybrid species *Meconopsis*× *cookei* G．Taylor（Papaveraceae）based on Nuclear Ribosomal DNA ITS region sequence ［J］．*Acta Genet Sin*（遗传学报），**31**（9）：901—907